

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 4 月 24 日 (24.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/033683 A1

(51) 国際特許分類:
// (C12P 23/00, 23:00, C12R 1:645)

C12N 1/14

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山岡 到保 (YAMAOKA, Yukiho) [JP/JP]; 〒737-0133 広島県 呉市 広末広二丁目 2 番 2 号 独立行政法人産業技術総合研究所中国センター内 Hiroshima (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP02/10619

(22) 国際出願日:

2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(74) 代理人: 阿形 明, 外 (AGATA, Akira et al.); 〒105-0004 東京都 港区 新橋二丁目 1 2-5 池伝ビル3階 阿形特許事務所 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語:

日本語

(81) 指定国 (国内): CN, US.

(30) 優先権データ:

特願 2001-318746

2001 年 10 月 16 日 (16.10.2001) JP

特願 2002-132190 2002 年 5 月 7 日 (07.05.2002) JP

特願 2002-231126 2002 年 8 月 8 日 (08.08.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-0013 東京都千代田区霞ヶ関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MICROORGANISM AND PRODUCTION OF CAROTINOID COMPOUNDS THEREBY

(54) 発明の名称: 微生物及びそれによるカロチノイド化合物の製造

(57) Abstract: It is intended to provide a process for conveniently and efficiently producing a large amount of astaxanthin and canthaxanthin from a material which can be easily obtained. A microorganism *Thraustochytrium* sp. CHN-3 (FERM P-18556) capable of producing astaxanthin and canthaxanthin, which belongs to the genus *Labyrinthula* and the species *Thraustochytrium*, is cultured and thus astaxanthin and canthaxanthin are accumulated in the microbial cells. Then the cells are separated from the medium and astaxanthin and canthaxanthin are collected from the separated cells by extracting with a solvent.

(57) 要約:

入手容易な原料から、簡単かつ効率よくアスタキサンチン及びカンサキサンチンを大量生産しうる方法を提供する。ラビリンチュラ属スラウストキトリウム種に属するアスタキサンチン及びカンサキサンチン生産微生物スラウストキトリウム sp. CHN-3 (FERM P-18556) を培養し、微生物体中にアスタキサンチン及びカンサキサンチンを蓄積させたのち、微生物体を培地から分離し、分離した微生物体から溶媒抽出処理によりアスタキサンチン及びカンサキサンチンを回収する。

WO 03/033683 A1

明 細 書

微生物及びそれによるカロチノイド化合物の製造

5 技術分野

本発明は、ラビリンチュラ (*Labyrinthula*) 属スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) 種に属する新規な微生物株及びそれを用いて天然カロチノイド化合物であるアスタキサンチン及びカンサキサンチンを製造する方法に関するものである。

10

背景技術

アスタキサンチン及びカンサキサンチンは、微生物の微生物体、藻類、微細藻類あるいは各種の植物体や動物体に天然カロチノイド化合物として広く存在する色素化合物であり、老化防止剤、解毒剤、ガン予防剤、
15 養殖魚類の色調改善剤として利用されている。

これらの天然カロチノイド中のアスタキサンチンは、甲殻類動物の殻から抽出されているが、これらの生物体中における含有量が極めて低い上に、抽出条件がむずかしく、しかも海洋の限られた区域にのみ生息する生物資源であり、安定した原料供給を確保することが困難であるため、
20 工業的生産には不向きである。

アスタキサンチンは赤色酵母 (*Phaffia rhodozyma*) により生産されるが、この赤色酵母は増殖速度が遅く、生産量が少ない上に、強固な細胞壁を有するため、生産されたアスタキサンチンの抽出が困難である。しかも、(3R,3R') 異性体の含有率が高く、化学構造が天然のアスタキ
25 サンチンとは反対の配置をとる化合物を副生するため、生産効率が低くなるのを免れない。

そのほか、アスタキサンチンを生産する緑藻類 (*Haematococcus pluvialis*) も知られているが、これは増殖速度が遅く、細胞壁が強固

であるため、生産効率が低い上に、雑菌の汚染を起しやすく、しかも特殊な培養装置を用いて強い光を照射しながら培養する必要があるなど、製造上種々の制約を伴うため、工業的に製造するには多くの問題がある。

- カンサキサンチンは、ある種のキノコ、魚類、甲殻類中に存在し、また
5 たブレバクテリウム属、ロドコッカス属に属する微生物により生産されることが知られている。化学合成により人工的に得る方法も開発されているが、いずれにしても生産効率が低いため、工業的な生産は行われていない。

10 発明の開示

本発明は、このような事情のもとで、従来方法のもつ欠点を克服し、入手容易な原料から、簡単かつ効率よくアスタキサンチン及びカンサキサンチンを大量生産しうる方法を提供することを目的としてなされたものである。

- 15 本発明者は、日本の瀬戸内海で採取された海洋性微生物の生態について種々研究を重ねた結果、その体中にアスタキサンチン及びカンサキサンチンの生産能力の高い新規な微生物が存在すること、したがってこの微生物を培養することにより、アスタキサンチン及びカンサキサンチンを効率よく製造しうることを見出し、この知見に基づいて本発明をなす
20 に至った。

- すなわち、本発明は、ラビリンチュラ属スラウストキトリウム種に属する新規に分離されたアスタキサンチン及びカンサキサンチン生産微生物スラウストキトリウムsp. CHN-3 (FERM P-18556)、及びこの微生物を培養して微生物体中にアスタキサンチン及びカンサキサンチンを蓄
25 積させたのち、微生物体を培地から分離し、分離した微生物体から溶媒抽出処理によりアスタキサンチン及びカンサキサンチンを回収することを特徴とするアスタキサンチン及びカンサキサンチンの製造方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明微生物の電子顕微鏡写真である。

図 2 は、スラウストキトリウムの生活環を示す説明図である。

図 3 は、実施例 1 で得た培養物の高速液体クロマトグラムである。

5 図 4 は、アスタキサンチンの生産量と培地の pH との関係を示すグラフである。

図 5 は、実施例 6 におけるアスタキサンチン及びバイオマスの生産量と培地の pH との関係を示すグラフである。図中、AX はアスタキサンチン、BM はバイオマスを示す。以下、各図とも同じ。

10 図 6 は、カロチノイドの生産量と窒素源の種類と関係を示すグラフである。図中、CX はカンサキサンチン、PX はフェノコキサンチンを示す。以下、各図とも同じ。

図 7 は、カロチノイドの生産量と光源の有無及び種類と関係を示すグラフである。

15 図 8 は、カロチノイドの生産量とアルカリ濃度と関係を示すグラフである。図中、CT はカロテンを示す。

図 9 は、カロチノイドの生産量と塩分濃度と関係を示すグラフである。

20 図 10 は、カロチノイドの生産量とチアミンの添加量と関係を示すグラフである。図中、ES はアスタキサンチンの脂肪酸エステルを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、添付図面に従って、本発明を詳細に説明する。

25 図 1 は、本発明の微生物の形態を示す電子顕微鏡写真である。この図から分るように、本発明の微生物は、ヤブレッツボカビ類のスラウストキトリウム (Thraustochytrium) の特徴である球形ないし長円球状の外質ネットをもつ細胞からなっており、かつサゲノジェネートソームが細胞体の 1 か所のみ存在し、そこから外質ネットを伸長させて基質に進入

又は付着する性質を有している。これらの特徴を参考にして、この微生物がヤブレッツボカビ類に属すると結論された。

図 2 に示す生活環が形成され、グルコースやフルクトースのような糖、酵母エキス、コーンステープリカーのようなタンパク質などの有機物
5 に富んだ培地では、アメーバ状細胞が現れるが、この特徴はウルケニア (Ulkenia) 属とは大きく異なっていること、及び 2 種類のべん毛を有する遊走子を形成する点でスキゾキトリウム (Schizochytrium) 種と異なっていることから、スラウストキトリウムと同定される。18SrDNA に
10 基づく分子系統樹においてもスラウストキトリウムであると同定することの裏付けが得られた。

本発明の微生物は、その栄養細胞が卵形ないしは球形である点で、紡錘形のラビリンチュラ種とは容易に区別されることによって、ラビリンチュラ属のスラウストキトリウム種に分類されるものである。この種の微生物は、海洋環境に広く存在し、従属栄養で増殖する、いわゆる海生
15 微生物として知られる。

本発明の微生物は、以下に示す微生物学的性質から、容易に公知の微生物と区別することができる。

I. 形態学的性質

- (1) 細胞の大きさは、 $10\ \mu\text{m}$ で卵形である。
20 (2) $10\ \mu\text{m}$ の卵形の遊走子にヘテロコントな鞭毛を有し、運動をする。

II. 培養的性質

- (1) 糖質寒天培地で培養すると、色はピンク、表面は滑らかで生育は速い。
(2) 液体培養では、24 時間で混濁を生じ、ピンクの色を呈する。
25 培地 1 リットル当り 30 g 以上のバイオマスが得られる。

III. 生理的性質

- (1) アスタキサンチンとカンサキサンチンを有して、ピンク色である。
(2) 有機質および無機質の窒素を利用して増殖する。

(3) pHは5～9、温度は15～35℃が最適生育条件である。

(4) グルコースやフルクトースを利用してDHA, EPAを多量につくる。

これまでのラビリンチュラ属スラウストキトリウム種では、DHAを
5 高含量で含有したり、色素を含有する株は知られていない。

また、細菌学的試験の結果は、いずれの項目もマイナスであり、細菌としての分類には該当しないことが確認された。

このようにして、従来未知の微生物であることが確認された本発明の微生物、すなわちスラウストキトリウムsp. CHN-3は、〒305-8566
10 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（IP0D）に寄託されている（寄託日2001年10月9日、受託番号FERM P-18556）。

本発明の微生物は、海洋に生息する10μm程度の単細胞微生物であり、例えば瀬戸内海の海水中から容易に採取される。原体の採取は、海
15 水中にクロマツの花粉を懸濁させ、数日放置したのち、花粉を海水から分離し、花粉表面に付着した微生物体を集めることにより行うことができる。

このようにして採取した原体を、糖類培地、すなわち糖類とペプトンを豊富に含む培養液（例えば海水1リットル中にグルコース30～50
20 gとペプトン1gを含む培地）中で純粋培養する。本純粋培養は、一定温度において光を、好ましくは青色光（波長420～470nm）を連続照射しながら、通気攪拌条件で行うのが好ましい。照射光として、赤色光（波長600～700nm）を青色光と併用することができる。

このようにして、培養で得られたスラウストキトリウムの細胞を乳鉢
25 で破碎し100%アセトンで抽出し、ODSC18のカラムを装着した高速液体クロマトグラフ及び高速液体クロマトグラフィー質量分析計で分離、同定した。このようにして得た液体クロマトグラムを図3に示した（実施例1参照）。その結果、色素はα-及びβ-カロテン、エキネノン、カ

ンサキサンチン、フェノコキサンチン、アスタキサンチンからなっていることが分った。

本発明のスラウストキトリウムsp. CHN-3は、このような α -及び β -カロテン、エキネノン、フェノコキサンチン、アスタキサンチンを
5 生産し、特にアスタキサンチン及びカンサキサンチンを大量に細胞内に蓄積することにより赤色に着色する。これまで知られているスラウストキトリウムが属するラビリンチュラ属の微生物では、このような能力を有しているものは知られていない。

このラビリンチュラ属のスラウストキトリウム種に分類される微生物
10 スラウストキトリウムsp. CHN-3は、糖類、有機窒素、無機塩からなる培地（培養液）中で培養することができる。

この際の糖類の例としては、グルコース、ショ糖、フルクトースやそれらを含むもの、例えば水飴などを、有機窒素源の例としては、ペプトン、酵母エキスなどを、無機塩の例としては、塩化ナトリウムや塩化カリ、無機リン酸塩などを挙げる
15 ことができる。

スラウストキトリウムsp. CHN-3は、グルコース、有機窒素、光エネルギー、無機のリンで生育する微生物であるが、その生産機能を最大限に発揮させるためには光照射の照度、温度、培地中の栄養分組成及び酸素供給量を適切に調整することが必要である。

20 高濃度塩分及び高アルカリ性の培地で培養することが最もよい結果をもたらす。

例えば、純粋培養の条件としては、通気攪拌、光照射は青色光を1,000ルクス以上、温度は20～30℃、好ましくは28℃前後である。培地中のリンの供給源は、 KH_2PO_4 が好ましく、その濃度としては0.1～3g/リットルの範囲が好ましい。ラビリンチュラ属微生物が生育
25 できる範囲の組成（海水1リットルにグルコース60g、ペプトン1g、 KH_2PO_4 1gあるいは海水1リットルにグルコース30g、ペプトン1g、酵母エキス1g）の培地中で培養を行い、生育が停止した段階で、培地

中の栄養成分濃度が所定の範囲になるように調整することにより、アスタキサンチン及びカンサキサンチンのそれぞれの生産量を選択的に高めることができる。

本発明方法に用いる塩分は、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどが挙げられる。塩分の濃度は4～10%（重量）が好ましい。

本発明方法に用いるアルカリ性物質としては、炭酸カリウム、炭酸ナトリウムなどが挙げられる。培地のpHは9以上が良く、好ましくは10前後が良い。この培養は、pH4～12、好ましくはpH6～10の範囲で可能であり、pHが高くなるほど生産量は向上する。上記した各種の添加剤とは別に、ビタミン化合物、特にチアミンを5mg/リットルまでの濃度で培地に添加することによりアスタキサンチンの収量が顕著に向上する。チアミンの添加量が多いと、少量ながらアスタキサンチンの脂肪酸エステルが生産されることがある。

前記したように培養条件、特に培地中の窒素源組成を変化させることにより、スラウストキトリウムの増殖への刺激を強くすると、アスタキサンチン及びカンサキサンチンの生産をさらに増加させることができる。本発明方法に用いる窒素源としては、尿素、アンモニア、硝酸カリウムなどが挙げられ、その添加量は2%（重量）まで、好ましくは1%（重量）程度が良い。

したがって、アスタキサンチン及びカンサキサンチンを高収率で製造するには、スラウストキトリウムの生育環境条件を高塩分の極限条件に保持して、アスタキサンチン及びカンサキサンチンの生産機能を最大限に発揮させるのが有利である。それには、例えば培地中の酵母エキスの初期濃度を低くするのが効果的である。

培地中の窒素源である酵母エキスの量を少なくすると、アスタキサンチンの含量が微生物体（乾物）1g中に1.537mgという高い値に増大する。その時点で酵母エキスを含有しない培養液に変えると、スラウストキトリウムの細胞に取り込まれる窒素が存在しないので、アスタ

キササンチン含量が微生物体（乾物）1 g 中約 2 mg に増大する。

本発明方法により、アスタキササンチンを製造する場合には、初期段階では酵母エキスを添加した培地を用いて培養し、酵母エキスが消費された後は、窒素源を補給せずに、窒素源無添加条件下で培養するのがよい。

- 5 このようにして窒素源無添加培地で培養することにより、通常のように窒素源を添加して培養する場合に比べ、アスタキササンチンの収量は5倍以上になる。この際、酸素リッチの好気性条件下で培養すると、アスタキササンチンの収量を上げることができる。

- 10 カンサキササンチンを製造する場合には、初期段階では酵母エキスを添加した培地を用いて培養し、酵母エキスが消費された後は、窒素源を補給し、絶えず窒素源の存在する条件、かつ微酸性条件下で培養するのがよい。窒素源として硝酸カリウムのような無機窒素を添加して培養するとカンサキササンチンの生産が向上する（図6参照）。このようにして窒素源添加培地で培養することにより、窒素源無添加で培養する場合に比
15 べ、カンサキササンチンの収量は4～5倍以上になる。

- このようにして得られたアスタキササンチン及びカンサキササンチンを多量に含む微生物体から効率よくアスタキササンチン及びカンサキササンチンを抽出するには、アセトン、クロロホルム、メチルアルコール、ヘキサンなどの溶剤、あるいはこれらの混合溶剤を用いる溶媒抽出法によるの
20 が好ましい。

- このようにして、産生したアスタキササンチン及びカンサキササンチンが微生物体から抽出液中に分離される。次に、その抽出液をシリカゲル充填カラムに通してカロチノイドを吸着させ、メチルアルコール混合溶剤又はヘキサンークロロホルム混合溶剤で溶離することにより、100%
25 の収率でアスタキササンチン及びカンサキササンチンを回収することができる。通常、メチルアルコール混合溶剤としては、メチルアルコール90～95体積%で残りがクロロホルムの混合溶剤が用いられる。ヘキサンークロロホルム混合溶剤を溶離液とするときは、クロロホルム60～6

5 体積％で残りがヘキサンの混合溶剤が用いられる。

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによってなんら限定されるものではない。

5 実施例 1

瀬戸内海沿岸の長浜地区沖合から採取した海水にクロマツの花粉を懸濁して採取したスラウストキトリウムsp. CHN-1を純化したスラウストキトリウムsp. CHN-3を、海水中に、グルコース60g/リットル、ペプトン1g/リットル、リン酸二水素カリウム1g/リットル
10 及びリン酸イオンとしてのリン1g/リットルを含む、糖類に富んだ培地（pH5.0）に接種し、温度28℃、1000ルクスの白色光（蛍光灯使用）照射下、通気攪拌しながら6日間培養した。得られた培養液を遠心分離して、微生物体を捕集した。このようにして得た微生物体の電子顕微鏡写真を図1に示す。

15 次に、上記の微生物体をアセトン、クロロホルム、メチルアルコールで抽出し、この抽出液をシリカゲル（和光純薬社製、商品名「ワコーゲル」）を充填したカラムに通し、吸着させたのち、ヘキサン-クロロホルム及びメチルアルコールで順次溶離することにより、培地1リットル
20 当りアスタキサンチン及びカンサキサンチンをそれぞれ8.8mg、6.5mg得た。微生物体中のアスタキサンチン及びカンサキサンチンの含有量は、乾燥微生物体1g中にアスタキサンチン2.8mg、カンサキサンチン2.0mgであった。実施例1で得られたカロチノイドの高速液体クロマトグラムを図3に示す。図中の符号数字は以下の化合物に対応するものである。1：アスタキサンチン、2：フェノコキサンチン、
25 3：カンサキサンチン、4：エキネノン、5： α -カロチン、6： β -カロチン

実施例 2

海水中に、グルコース 50 g / リットル、ペプトン 1 g / リットル及びリン酸二水素カリウム 1 g / リットルを含む培地を用い、温度 23 °C において、(a) 白色光照度 1000 ルックスで培地を 100 rpm で回転振とうする培養、(b) 暗所で培地を 100 rpm で回転振とうする培養、(c) 照度 1000 ルックスで静置する培養、及び (d) 照度 1000 ルックスで通気攪拌する培養により、スラウストキトリウム sp. CHN-3 を 6 日間培養した。その結果を表 1 に示す。

表 1

10

		培養条件			
		(a)	(b)	(c)	(d)
生成物	アスタキサンチン (mg/g乾物)	0.8-1.0	0.2-0.5	0.1>	1.0-1.8
	バイオマス (g乾物/リットル)	2.01-2.62	1.37-1.46	0.26-0.39	2.46-3.10

この表から分るように、静置培養ではほとんどアスタキサンチンを生産しない。回転振とう培養では光を照射した方が多くのアスタキサンチンを得ることができる。さらに酸素濃度を高めるために空気を吹き込む方法を用いることにより、アスタキサンチンの収量を 1.8 倍向上させることができた。このように培養において好気条件を採用することにより、すなわち、培養液中の酸素濃度を高めることによりアスタキサンチンの生成比率を高めることができる。

20 実施例 3

実施例 1 で使用した糖類に富んだ培地の pH を、塩酸水溶液又は水酸化ナトリウム水溶液を用いて変化させた以外は実施例 1 と同様の培養試験を 14 日間継続し、各 pH 値に対するアスタキサンチンの生産量を求

めた。その結果をグラフとして図4に示した。このグラフから明らかに、pH値の上昇とともにアスタキサンチンの生産量は増大する。

実施例 4

- 5 海水（塩化ナトリウム濃度3.2%）中に、グルコース30g／リットル、ペプトン1g／リットル、酵母エキス1g／リットルを含む糖類に富んだ培地（以下、糖類培地という）に塩化ナトリウムを加えて塩化ナトリウム濃度の異なる各種の培養液を作製し、それらに実施例1に用いたスラウストキトリウムsp. CHN-3を接種し、温度28℃、100
- 10 0ルクスの白色光照射下、通気攪拌しながら6日間培養した。次いで培養液を遠心分離して、微生物体を捕集した。このようにして得たバイオマスとカロチノイドの収量はそれぞれ2～5g／リットルと0.5～1mg／gであった。

- 上記で得た微生物体をアセトン、クロロホルム、メチルアルコールで
- 15 抽出し、この抽出液をODSC18のカラムを装着した高速液体クロマトグラフで分析した。微生物体のアスタキサンチン及びカンサキサンチン含有量（微生物乾燥体中での濃度）は乾燥微生物体1g当りアスタキサンチン1.0～2.0mg、カンサキサンチン0.3～0.5mgであった。

20 実施例 5

- 海水1リットルにグルコース50g、ペプトン1g及びリン酸二水素カリウム1gを添加した培地を用い、温度23℃、照度1000ルクスの蛍光灯からの白色光又は青色光（波長470nm）の照射下又は非照射下、培地を回転数100rpmで回転振とうさせながら、空気を供給して攪拌する方法でスラウストキトリウムsp. CHN-3を培養した。
- 25 その結果を図7のグラフに示した。

このグラフから分るように、暗黒条件ではアスタキサンチンの生産が少ない。光照射下の回転振とう培養では白色光での照射より青色光を照

射した方が多量のアスタキサンチンを得ることができた。このように培養液に照射する青色光の強さを高めることによりアスタキサンチンの生成比率を高めることができる。

5 実施例 6

糖類培地の pH を変化させた以外は実施例 4 と同じ条件の培養を 14 日間継続し、アスタキサンチンの生産量を求めた。その結果をグラフとして図 5 に示す。このグラフから明らかなように、概ね pH 4 - 10 の範囲内で pH の上昇とともにアスタキサンチンの生産量は増大する。

10

実施例 7

糖類培地に Na_2CO_3 を添加量を変えて添加した以外は実施例 4 と同じ条件で培養を 7 日間継続し、バイオマス量、アスタキサンチン、カンサキサンチンの生産量を求めた。その結果をグラフとして図 8 に示す。この

15 グラフから明らかなように、 Na_2CO_3 の濃度が 1.6 % まで上昇するに従ってバイオマス量とアスタキサンチンの生産量は増大する。

実施例 8

糖類培地に NaCl を添加量を変えて添加した以外は実施例 4 と同じ条件

20 で培養試験を 7 日間継続し、バイオマス量、アスタキサンチン、カンサキサンチンの生産量を求めた。 NaCl 濃度の各増分における生産量をグラフとして図 9 に示す。このグラフから明らかなように、 NaCl の濃度が 6 % まで上昇するに従ってバイオマス量とアスタキサンチンの生産量は増大する。

25

実施例 9

糖類培地にビタミン化合物であるチアミンを添加量を変えて添加した以外は実施例 4 と同じ条件で培養試験を 7 日間継続し、バイオマス量、

アスタキサンチン、カンサキサンチンの生産量を求めた。その結果をグラフとして図10に示す。このグラフから明らかなように、チアミンの添加量の上昇とともにバイオマス量とアスタキサンチンの生産量は増大する。チアミン濃度が高くなるとアスタキサンチンの脂肪酸エステル
5 (ESで示す) が副生することがわかる。

産業上の利用可能性

本発明によると、特にアスタキサンチン、カンサキサンチンを高含有率で含むスラウストキトリウムの微生物体を純粹に大量培養でき、かつ
10 これからアスタキサンチン及びカンサキサンチンを簡単に抽出分離することができ、高収率で高純度のアスタキサンチン、カンサキサンチン又は所望に応じた組成割合でアスタキサンチン及びカンサキサンチンの混合物を得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. ラビリンチュラ属スラウストキトリウム種に属する微生物株スラウストキトリウムsp. C H N - 3 (受託番号FERM P-18556)。
- 5
2. 請求の範囲第1項記載の微生物株を培地中で培養し、微生物体中にアスタキサンチン及びカンサキサンチンを蓄積させ、該微生物体を培地から分離し、分離された微生物体から溶媒抽出処理によりアスタキサンチン及びカンサキサンチンを回収する工程からなるアスタキサンチン
10 及びカンサキサンチンの製造方法。
3. 培地のpHを4ないし12に保ち、好気性条件下で培養を行う請求の範囲第2項記載の製造方法。
- 15 4. 培地がショ糖、グルコース及びフルクトースの中から選ばれる糖類を含有する請求の範囲第2項記載の製造方法。
5. 培養を光の照射下で行う請求の範囲第2項記載の製造方法。
- 20 6. 光照射に用いる光が波長420～470nmの青色光である請求の範囲第5項記載の製造方法。
7. 光照射に用いる光が波長420～470nmの青色光と波長600～700nmの赤色光の混合光である請求の範囲第5項記載の製造方
25 法。
8. 培地がビタミン化合物を含有する請求の範囲第2項記載の製造方法。

9. ビタミン化合物がチアミンである請求の範囲第 8 項記載の製造方法。
10. 培地が尿素、アンモニア、硝酸カリウムの中から選ばれる窒素化合物を含有する請求の範囲第 2 項記載の製造方法。
11. 請求の範囲第 1 項に記載の微生物株の培養物、微生物体又は微生物体の処理物。

1/6

図1

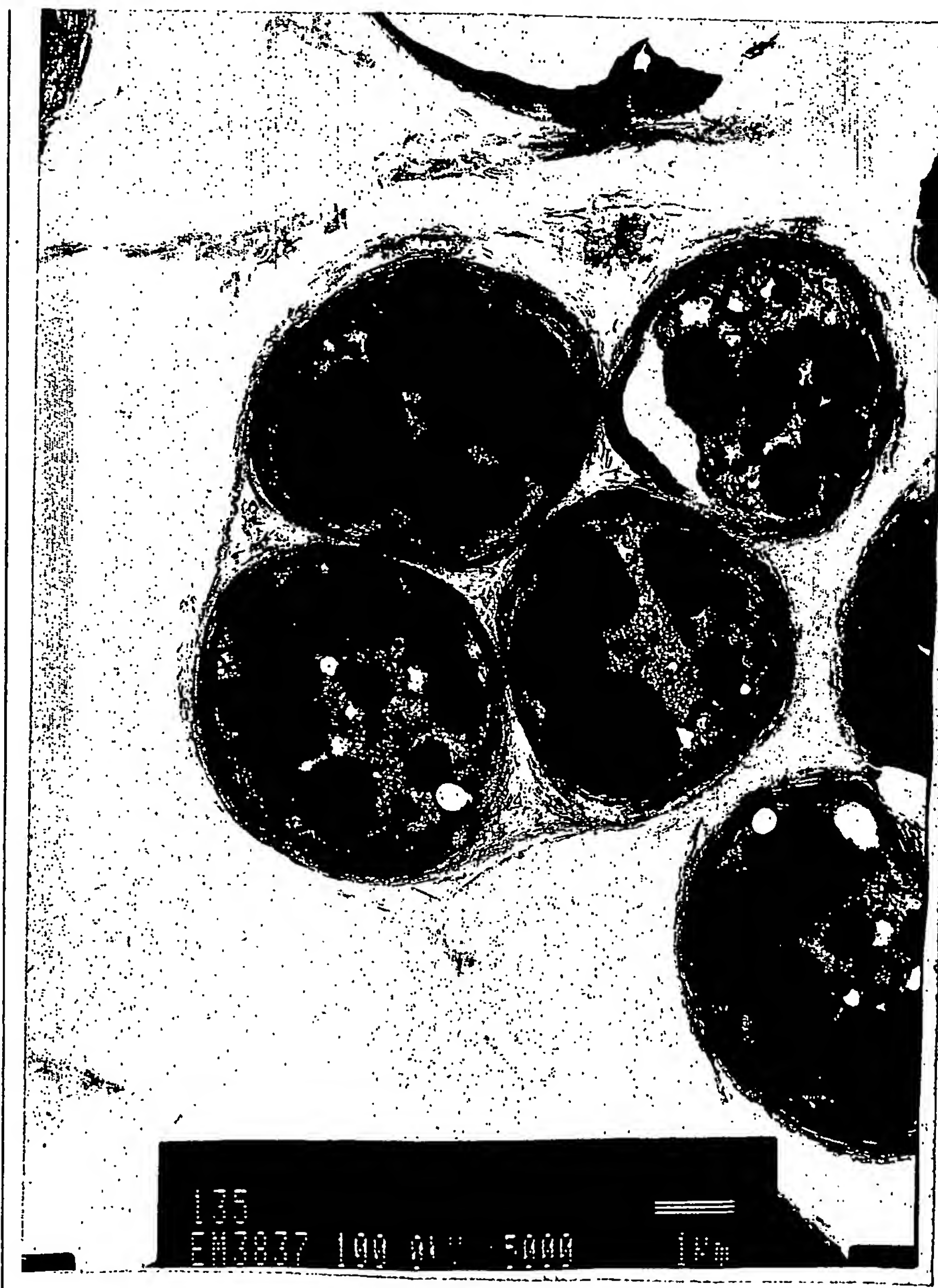


図2

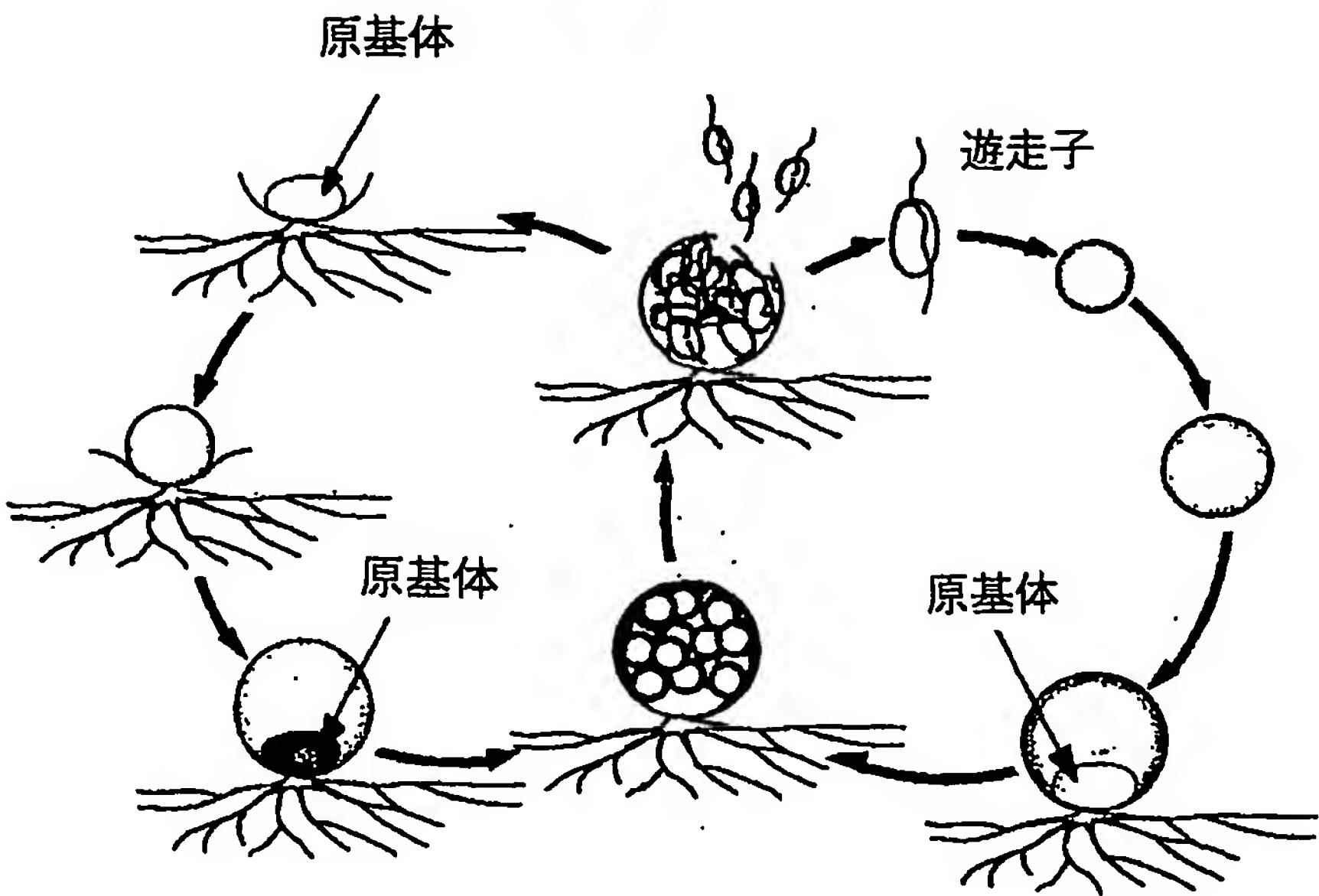


図3

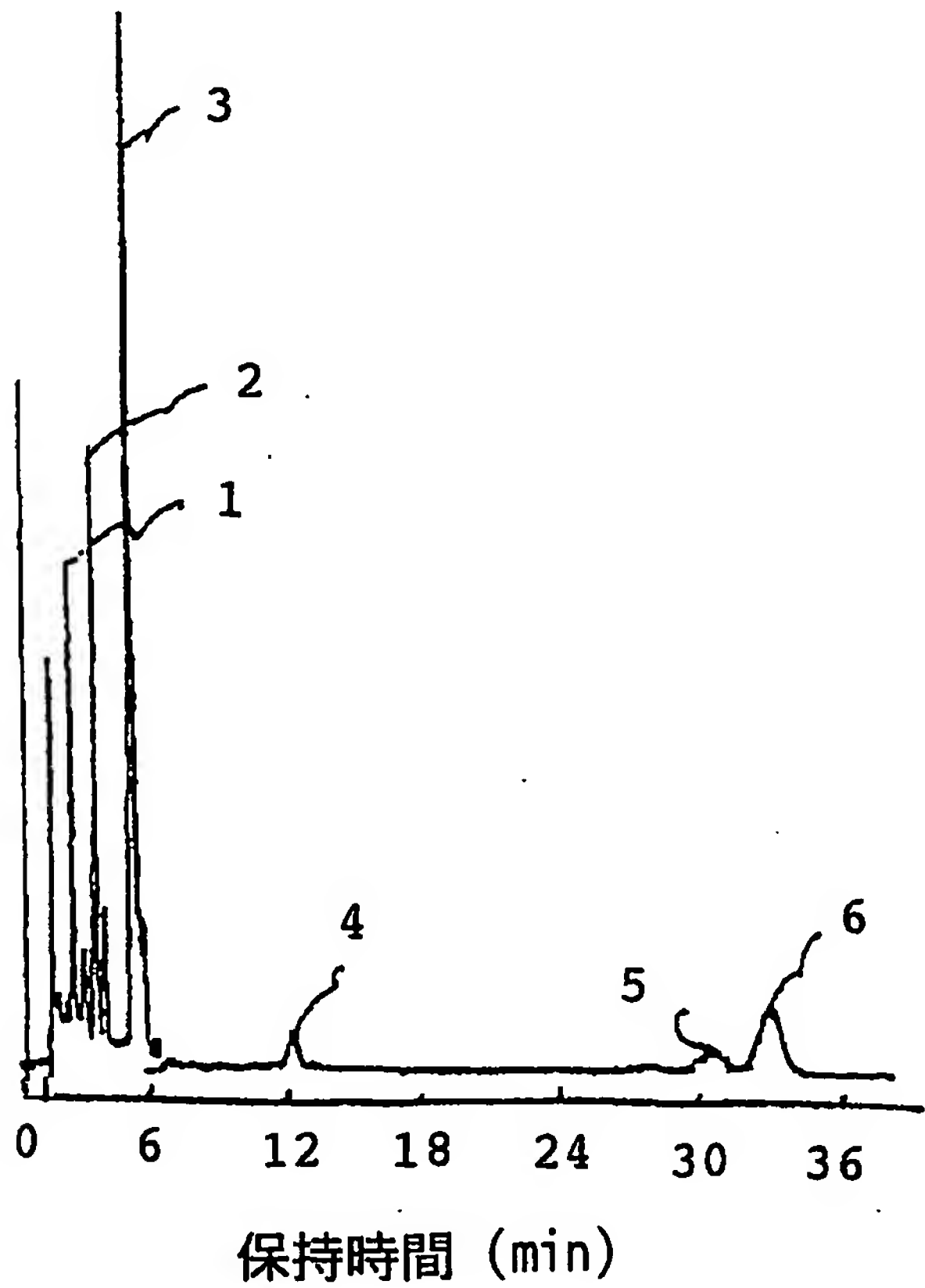


図4

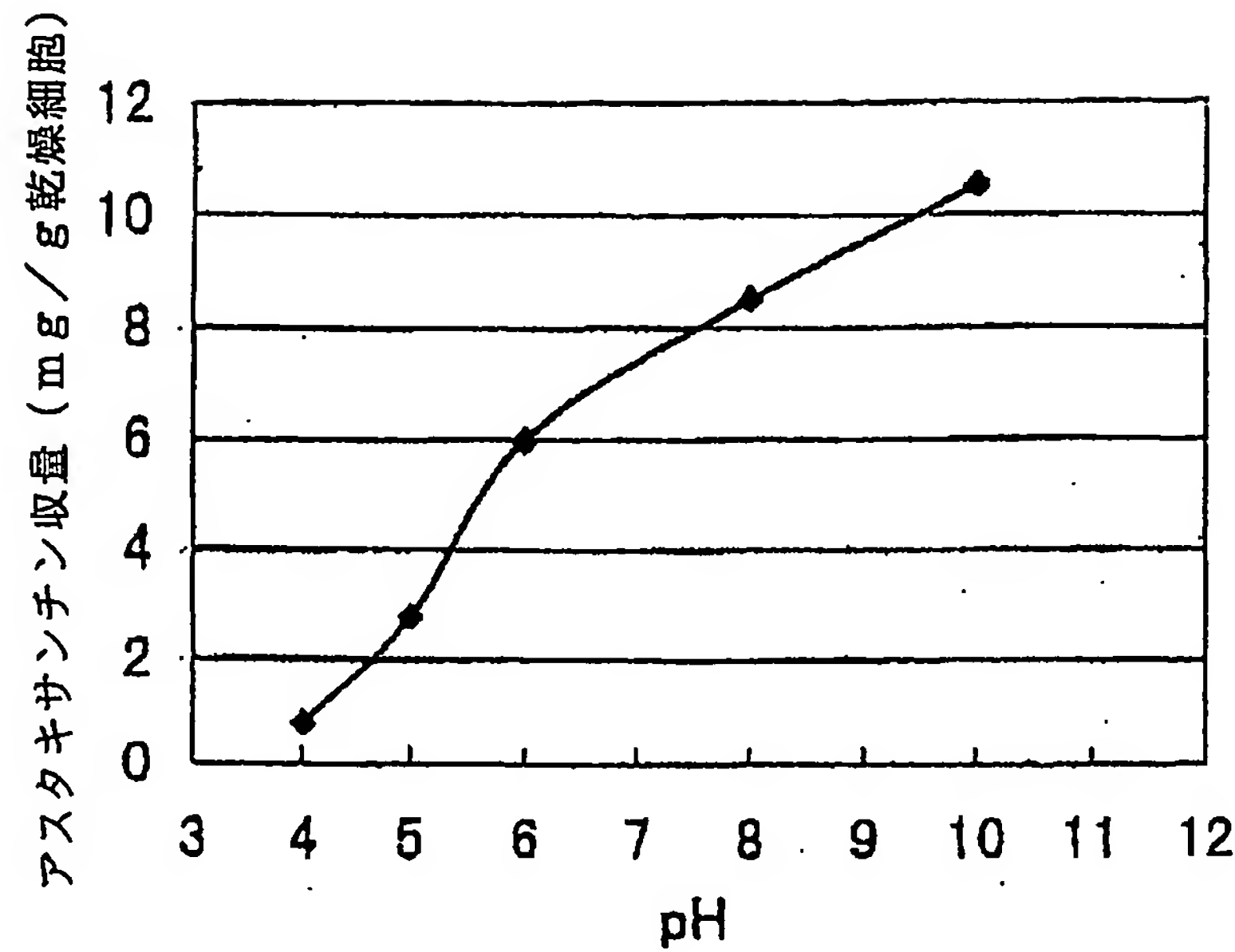
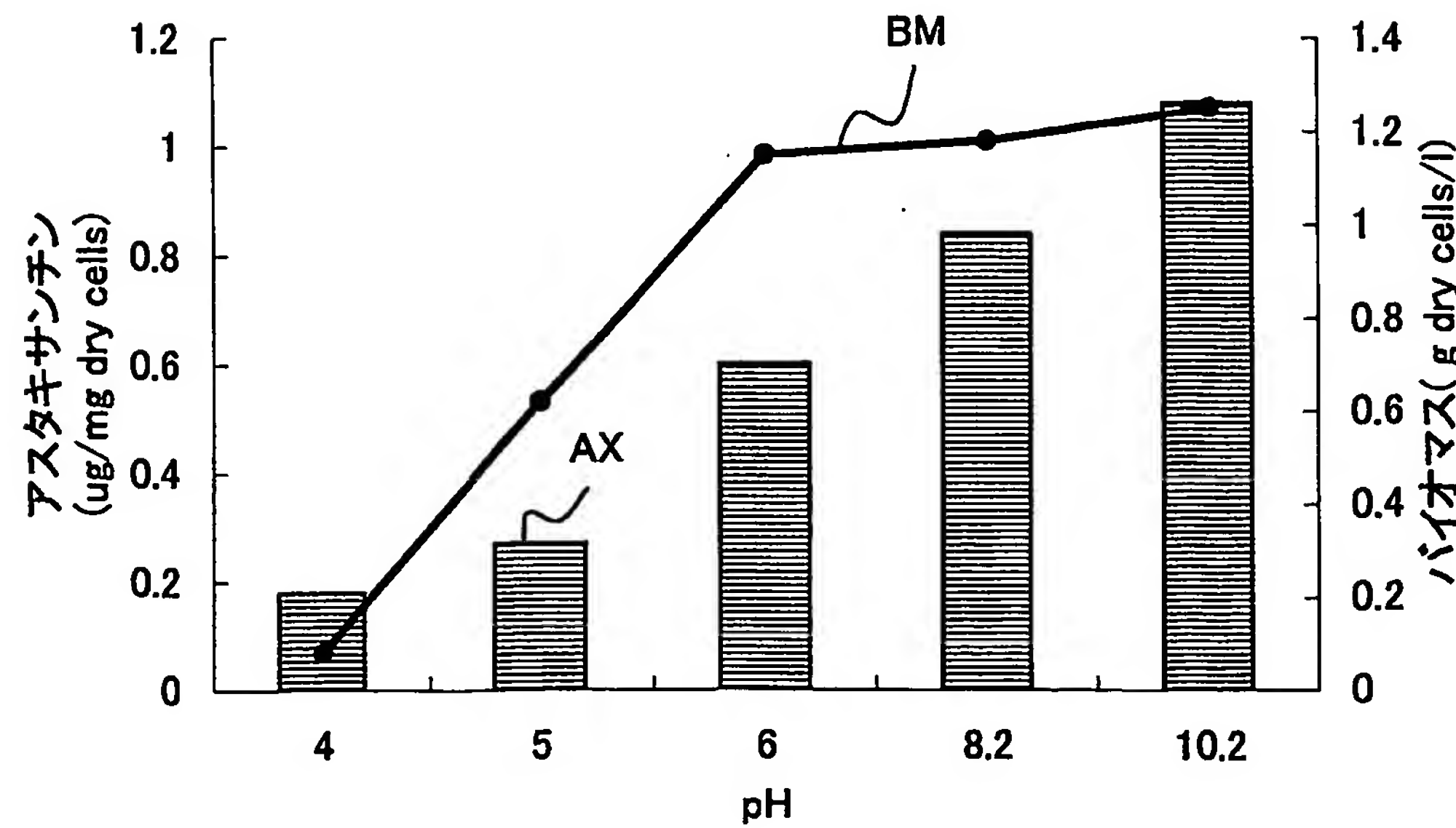


図5



4/6

図6

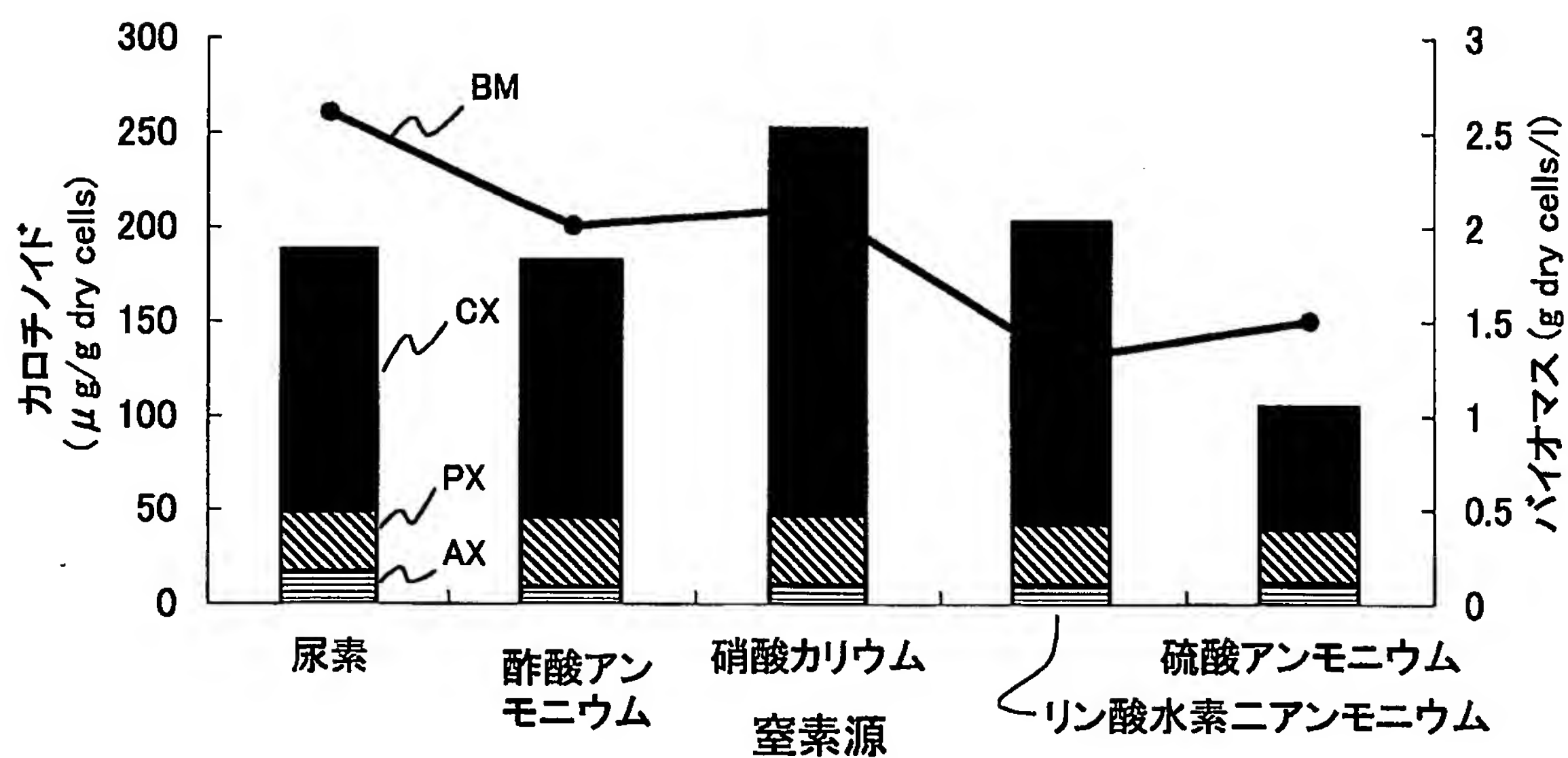


図7

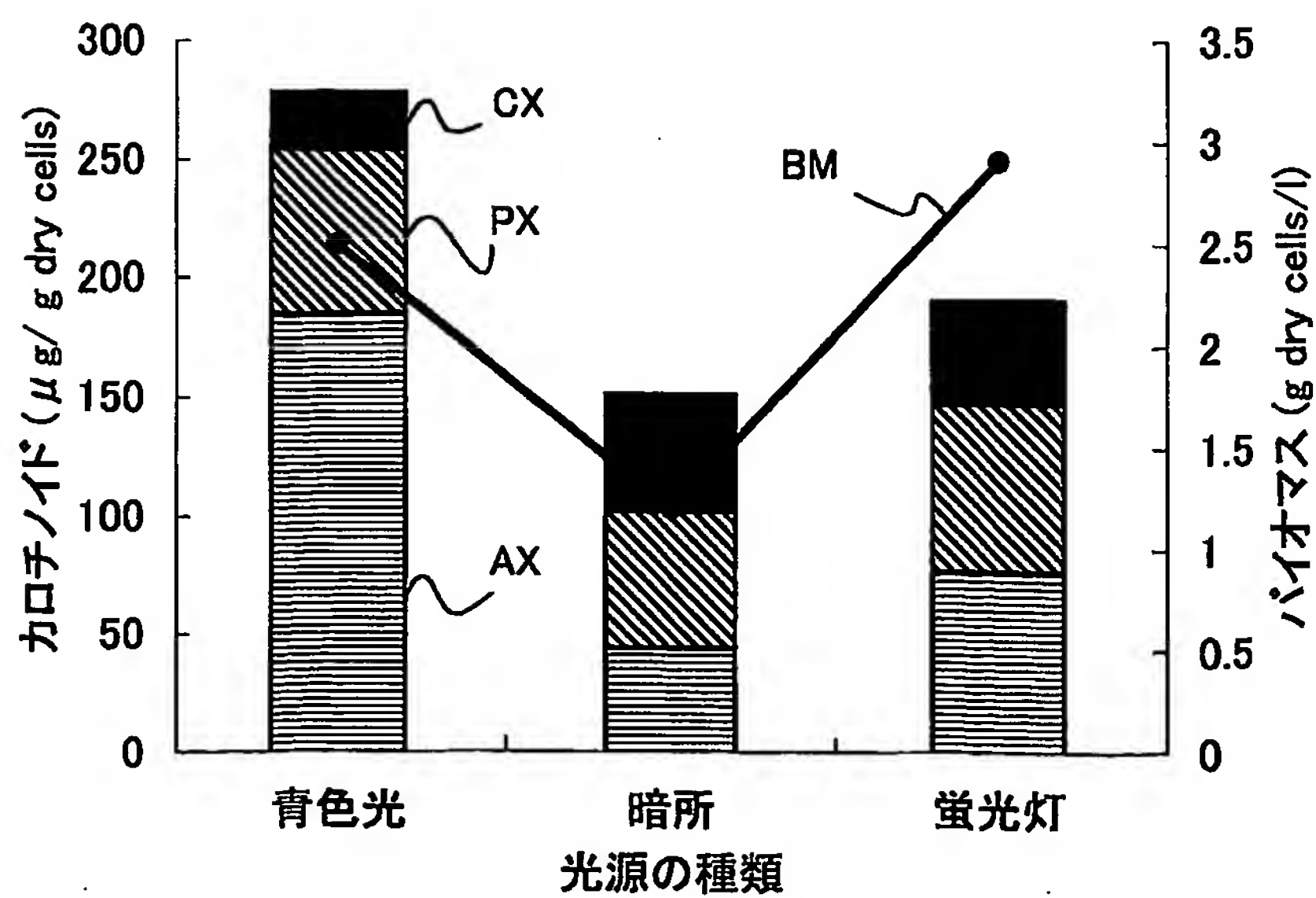
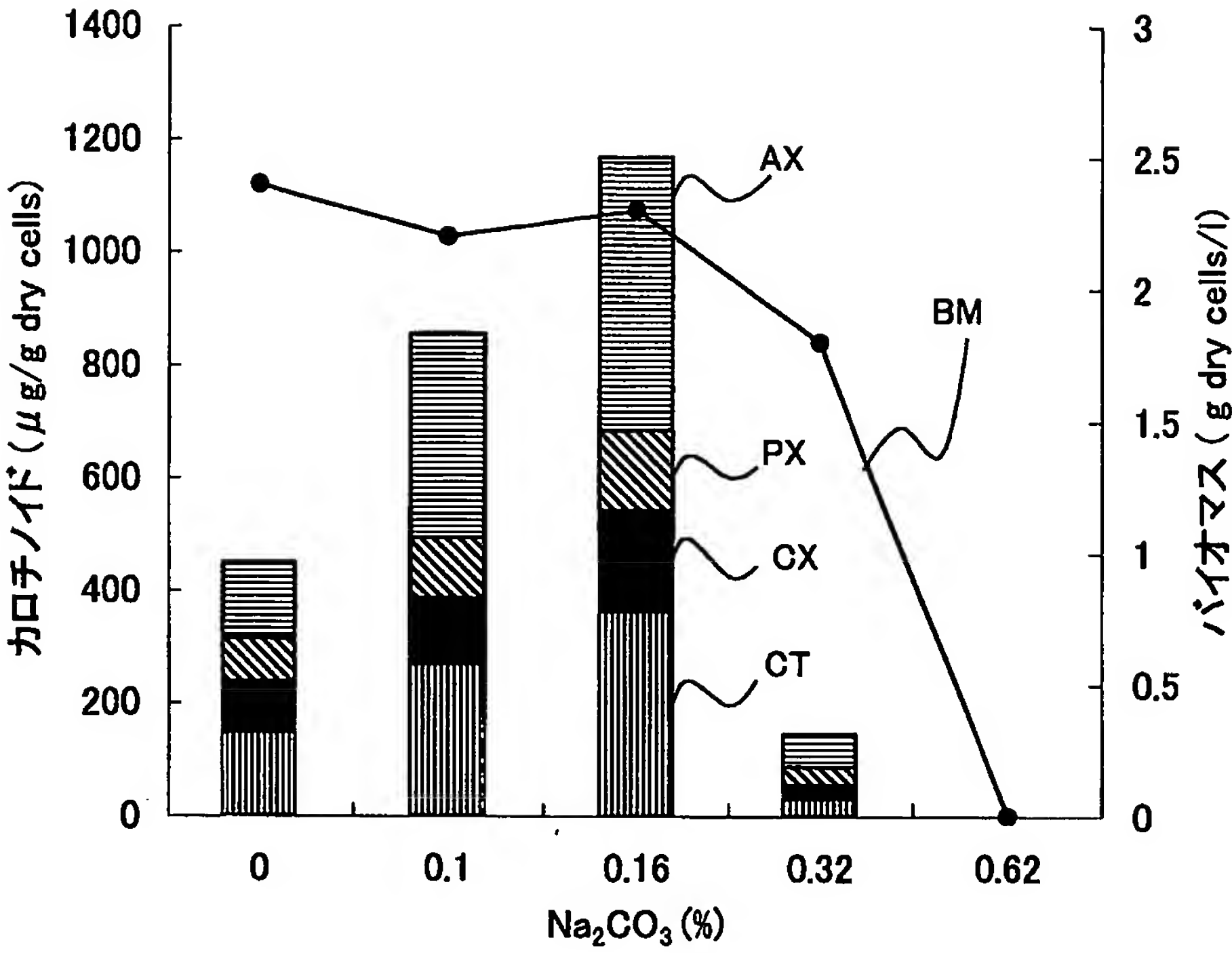


図8



6/6

図9

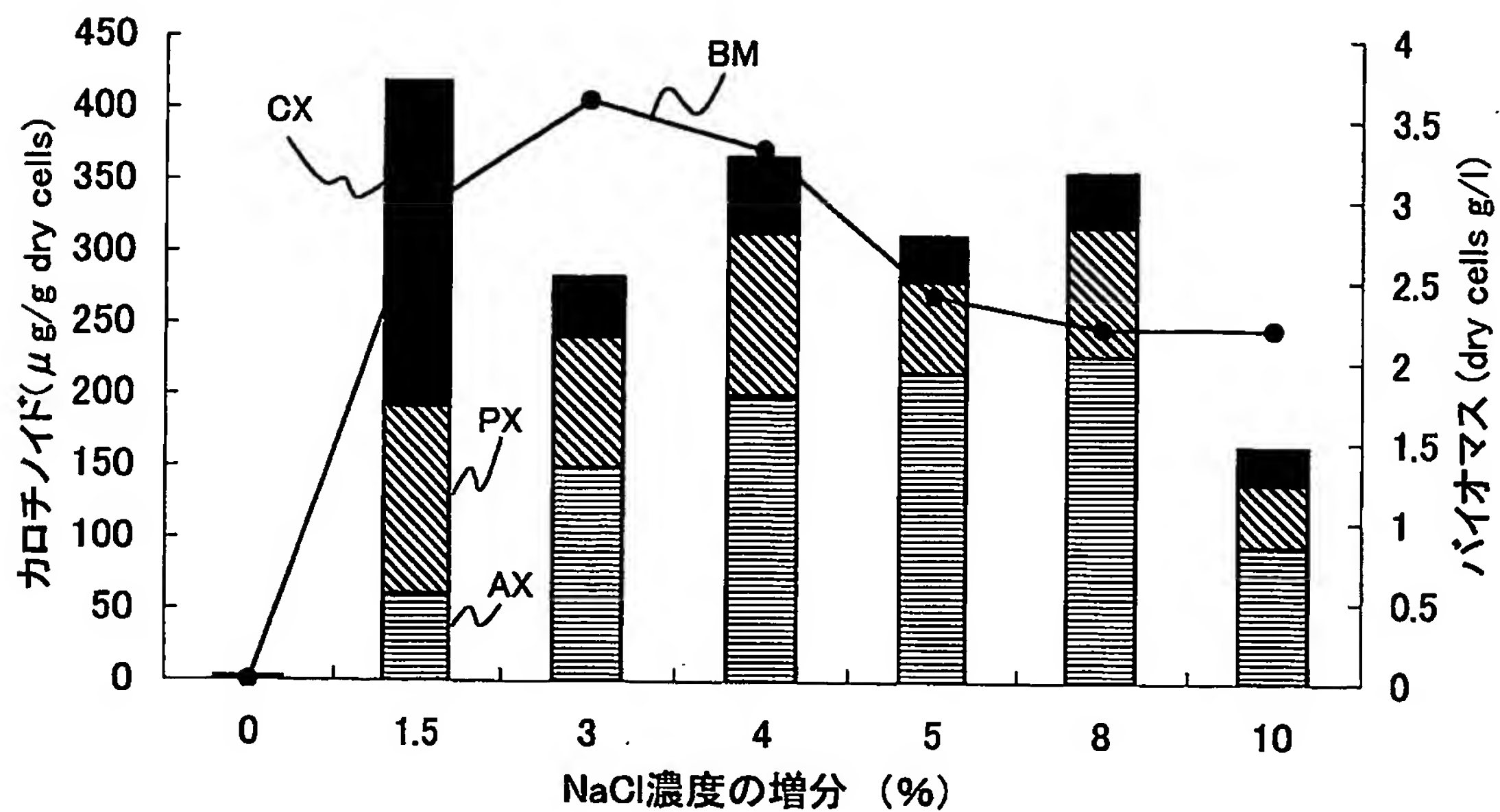
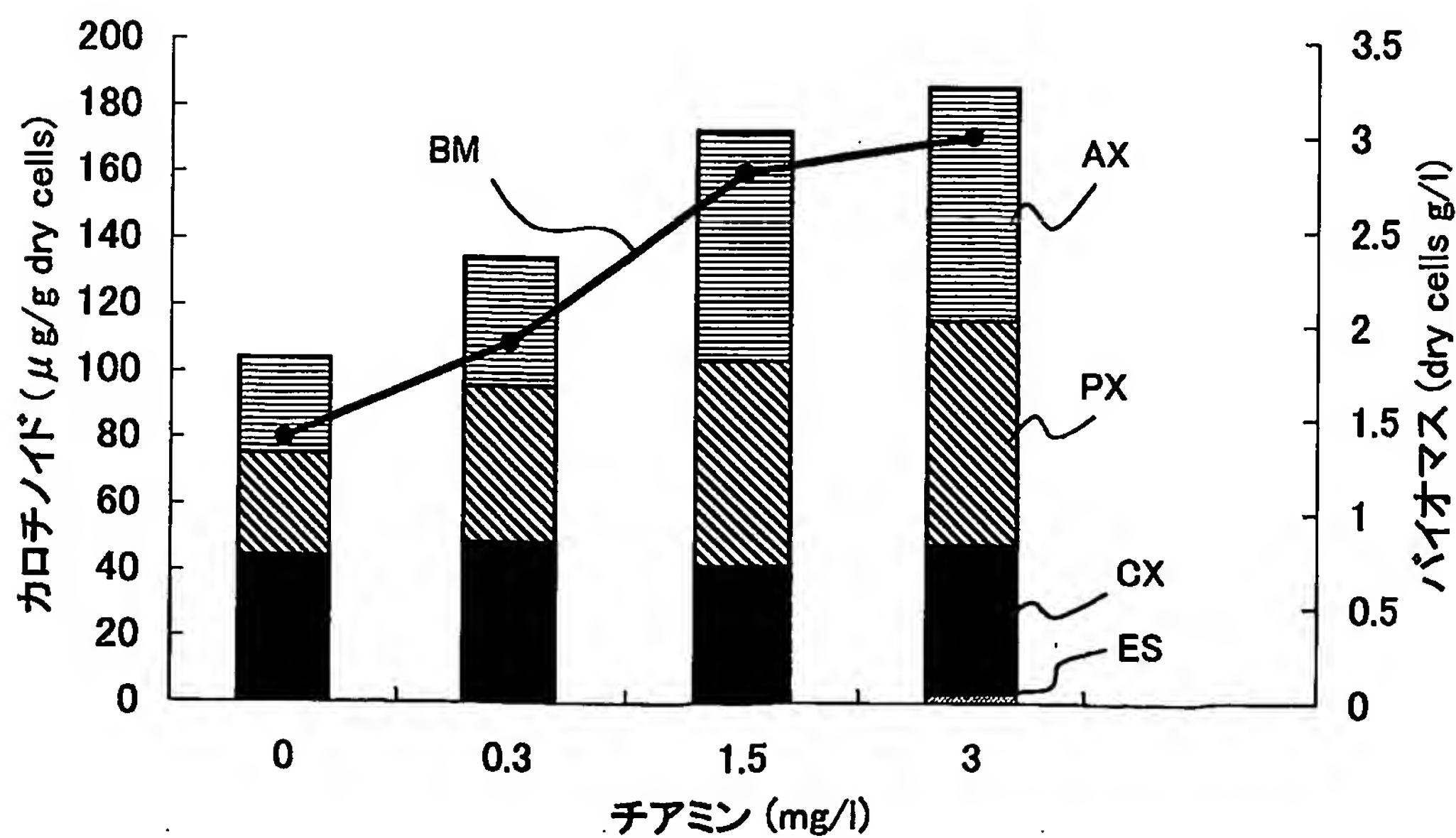


図10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/14, C12P23/00/(C12P23/00, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/14, C12P23/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-275656 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 09 October, 2001 (09.10.01), & US 2001/0041358 A1	1-11
P, A	JP 2002-291464 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 October, 2002 (08.10.02), (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 December, 2002 (03.12.02)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C12N1/14, C12P23/00// (C12P23/00, C12R1:645)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ⁷ C12N1/14, C12P23/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-275656 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001. 10. 09 & US 2001/0041358 A1	1-11
PA	JP 2002-291464 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2002. 10. 08 (ファミリーなし)	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	03. 12. 02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子
		4N 9637
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488